

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20742

研究課題名（和文）VRK1の中樞神経系における新たな生理機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of new physiological functions in the central nervous system of VRK1

研究代表者

梅田 涼平（Umeda, Ryohei）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90966300

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒトにおいて小頭症や運動機能障害を特徴とする神経変性疾患の原因遺伝子の一つであるVRK1に注目し、VRK1を欠損させたゼブラフィッシュ（VRK1KO）を作製・解析することで、VRK1が関与する小頭症や運動機能障害の分子メカニズム解明を目指した。
VRK1の欠損により神経細胞の減少を引き起こし、自発行動量の減少や不安様行動の異常を認めた。特にゼブラフィッシュ前脳領域における核膜形成異常およびヘテロクロマチンの増加および運動神経を含む神経細胞増殖の減少が、VRK1の関与する疾患の病態基盤に寄与する可能性が大きいこと示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではVRK1遺伝子欠損ゼブラフィッシュモデルを用いて小頭症および行動の異常などを認めた。さらに神経細胞における核膜形成の異常や神経増殖の減少など神経細胞に形態的な異常を認めた。以上より、VRK1が寄与する中樞神経系における小頭症や運動機能障害を特徴とする神経変性疾患に関連する病態基盤の一部を解明した。これまでにVRK1が寄与する小頭症や運動機能障害を特徴とする神経変性疾患のメカニズムについての報告はほとんどなく、本研究の結果はVRK1が関与する病態基盤の解明の一助となると示唆される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on VRK1, one of the causative genes of neurodegenerative diseases characterized by microcephaly and motor dysfunction in humans, and aimed to elucidate the molecular mechanisms of VRK1-related microcephaly and motor dysfunction by generating and analyzing zebrafish lacking VRK1 (VRK1KO).

VRK1 deficiency caused a decrease in neurons, and we observed a decrease in locomotor activity and abnormal anxiety-like behavior. In particular, we showed that nuclear envelope abnormalities and increased heterochromatin in the zebrafish forebrain region, as well as a decrease in neuronal proliferation, including motor neurons, are likely to contribute to the pathological basis of diseases involving VRK1.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：VRK1 zebrafish 小頭症 運動機能異常 脳・神経 行動解析

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Vaccinia related kinase 1 (VRK1) は serine/threonine kinase family の一種であり、DNA 損傷に反応して p53 をリン酸化し、アポトーシスや細胞周期の停止を誘導する遺伝子である。VRK1 の変異を有するヒトでは、脊髄性筋萎縮症や小頭症を呈する神経変性疾患を認め、さらに、VRK1 遺伝子をノックダウンしたマウスでは、運動機能の低下が報告されている。しかし、これらの疾患において VRK1 が寄与する病態生理機構の全容は解明されておらず、中枢神経において VRK1 がどのような役割を持つかについてもほとんど解明されていない。そこで本研究では VRK1 遺伝子を欠損させたノックアウトゼブラフィッシュ (VRK1KO) を作製し、予備実験にて行動解析をおこなったところ、VRK1KO では野生型ゼブラフィッシュに比べて自発運動量の低下や不安様行動の減弱を認めた。このことから VRK1 は中枢神経系においても生理機能を有する可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が独自に作製した VRK1KO を用いて行動生理学的解析、分子生物学的解析、形態学的解析を多角的に行うことにより、VRK1 の中枢神経系における新たな生理作用を解明し、本研究を通じて見出された生理機能をもとに、神経変性疾患における VRK1 の役割を明らかにするとともに、神経変性疾患の新たな病態生理機構を特定したい。

3. 研究の方法

(1) VRK1KO の樹立および表現型解析

VRK1KO は CRISPR/Cas9 システムを用いて VRK1 遺伝子を欠損させて樹立する。その後、VRK1KO を用いて自発運動量の変化と不安様行動を評価する Novel tank diving test (NTD) ならびに、社会性を評価する Social interaction test (SIT) を実施した。さらに VRK1 は小頭症に関連する遺伝子であることから、体重や脳のサイズを含む形態学的な解析を実施した。

(2) 神経伝達物質動態解析ならびに VRK1 遺伝子に起因する神経変性疾患のメカニズム解析

VRK1 は運動機能に障害が発生することが報告されていることから運動機能に関連する神経伝達物質の脳内含量を LC-MS/MS を用いて解析した。さらに、VRK1 に起因する神経の形態的な変化がどのようなメカニズムで発生するかを解明するために、電子顕微鏡を用いて神経細胞のミクロな形態を解析した。

4. 研究成果

(1) VRK1KO の樹立および表現型解析

VRK1KO の樹立

CRISPR/Cas9 システムを用いてゼブラフィッシュ VRK1 遺伝子の exon2 を 5 bp 欠損させることでフレームシフトを生じさせて VRK1 を欠損したゼブラフィッシュを樹立した (図 1)。

VRK1KO における行動解析

VRK1 遺伝子は認知機能または運動機能障害と関連することが報告されている。そこで一連の行動解析により、不安様行動や自発運動量を評価する NTD を行い自発運動量の変化と不安様行動を解析した。その結果 VRK1KO ゼブラフィッシュでは、自発運動量の減少および、不安様行動の減少が認められた (図 1)。社会性行動については、ゼブラフィッシュの社会性行動を評価するための行動実験系である SIT を実施したところ、VRK1KO において社会性行動の異常を認めた。これらの行動学的特徴は、VRK1 遺伝子との関連が報告されている神経変性疾患である小頭症のモデルと類似する点が多く、VRK1KO は病態モデルとしても有用性が高いことが考えられる。

VRK1KO における形態学的解析

VRK1KO にみられる脳の形態学的な変化について、ヘマトキシレン・エオジン染色を用いた脳サイズの評価を行い、VRK1KO において前脳、小脳領域で脳の断面積が縮小していることが明らかとなった。さらに Elav13 に対する免疫染色を用いて、特にヒトにおいて大脳や大脳辺縁系にあたる前脳部位での神経細胞の分布を評価したところ、VRK1KO において分布の様相に異常を認め、主に大脳皮質と海馬にあたる領域にお

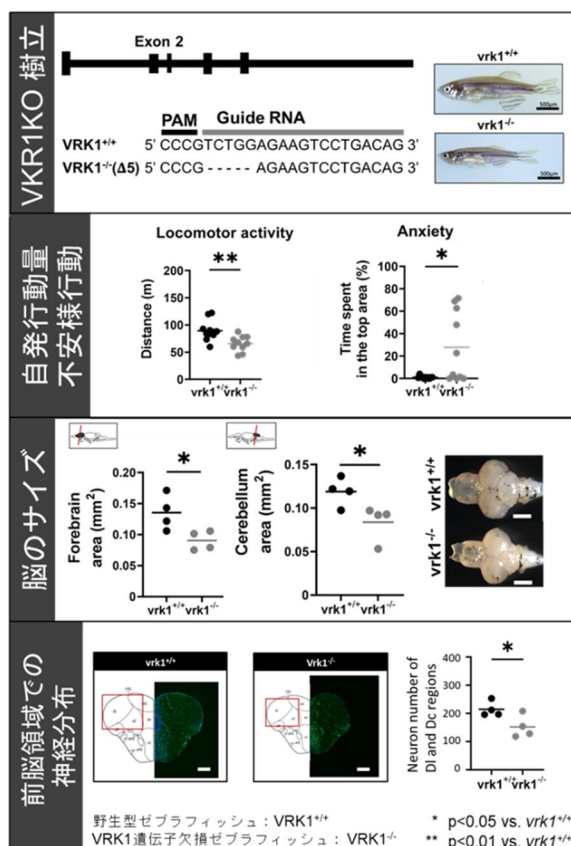


図1. VRK1KOの樹立および表現型解析

さらに Elav13 に対する免疫染色を用いて、特にヒトにおいて大脳や大脳辺縁系にあたる前脳部位での神経細胞の分布を評価したところ、VRK1KO において分布の様相に異常を認め、主に大脳皮質と海馬にあたる領域にお

いて神経細胞の数が減少していることが判明した(図1)。以上より、脳の形態においても小頭症と類似する変化を認めた。

(2) 神経伝達物質動態解析ならびに VRK1 遺伝子に起因する神経変性疾患のメカニズム解析
VRK1KO に関連する神経の形態学的な変化の解析

VRK1 は運動機能障害を特徴とする神経変性疾患に関連する遺伝子であり、これまでの研究で VRK1KO では自発行動量の減少を認めた。そのため、運動神経特異的マーカーである ISLET1 の promoter 下に EGFP が発現するトランスジェニックゼブラフィッシュをそれぞれ VRK1KO と交配し、VRK1 を欠損した ISLET1::EGFP ゼブラフィッシュを作製し、稚魚のゼブラフィッシュを用いて神経の分布密度および神経樹状突起の形態について、ライトシート顕微鏡を用いて解析した。その結果、VRK1KO 稚魚において野生型と比較して運動神経の減少を認めた(図2, A および B)。さらに VRK1 は Barrier to autointegration factor (BAF) のリン酸化を介して核膜の形成や DNA の複製に関与すると報告されていることから、核膜の形成やヘテロクロマチン形成について確認するため走査型電子顕微鏡を用いてよりミクロな解析を実施したところ、VRK1KO の前脳領域において野生型のゼブラフィッシュと比較して、核膜の形成異常およびヘテロクロマチンの形成を示す細胞の増加を認めた(図2, C および D)。以上より、運動神経の減少および哺乳類の大脳皮質や海馬の領域を含む前脳領域に存在する細胞の異常を介して、行動学的な表現型を示していた可能性が示唆された。

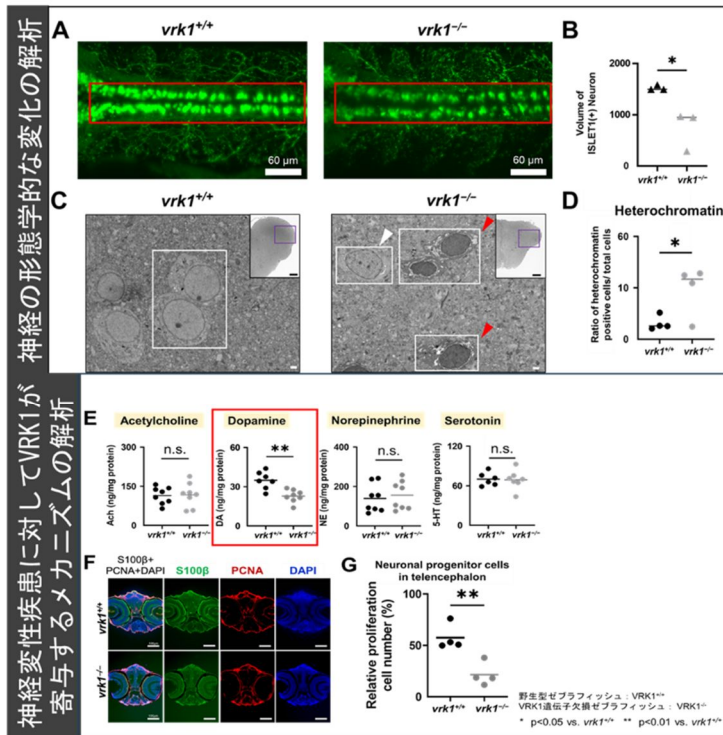


図2、神経伝達物質動態解析ならびにVRK1遺伝子に起因する神経変性疾患のメカニズム解析

VRK1KO の前脳領域において野生型のゼブラフィッシュと比較して、核膜の形成異常およびヘテロクロマチンの形成を示す細胞の増加を認めた(図2, C および D)。以上より、運動神経の減少および哺乳類の大脳皮質や海馬の領域を含む前脳領域に存在する細胞の異常を介して、行動学的な表現型を示していた可能性が示唆された。

VRK1KO における神経細胞増殖に寄与する因子についての分子生物学的解析

VRK1 はパーキンソン病などの運動機能障害をきたす疾患との関連が報告されている。さらにこれらの疾患においては神経伝達物質の働きが重要であることから、運動神経において関連性の強い神経伝達物質に着目し、VRK1KO 脳内の神経伝達物質の解析を実施した。その結果、野生型と比較して VRK1KO において報酬や運動の制御に深く関連するドパミンの脳内含量が減少していた(図2, E)。さらに、VRK1 は核膜の形成や DNA の複製を介して細胞の分裂に関連する BAF をリン酸化することから、細胞の増殖に寄与している可能性が高いことが予測された。そこで細胞増殖のマーカーである PCNA を用いて稚魚ゼブラフィッシュ前脳領域の細胞増殖を解析したところ、野生型に比較して VRK1KO において PCNA 陽性細胞の減少を認め、VRK1 の欠損が細胞増殖を減少させることが明らかとなった(図2, F および G)。以上より、VRK1 は核膜の形成やクロマチンリモデリングを介して細胞増殖を制御し、ドパミンを含む神経細胞の形成に重要な役割を持つことが示唆された。

総括

VRK1 が欠損することでゼブラフィッシュ前脳領域において核膜の形成や、クロマチンリモデリングの増加を介して細胞増殖が障害され、ドパミンを含む神経細胞の形成の低下を引き起こす。その結果として運動機能や不安様行動に異常を引き起こすことが示唆された。このことから VRK1 は核膜形成やクロマチンリモデリングに関連し、神経細胞における細胞増殖に関連する分子であることが示唆され、小頭症はこの細胞増殖に関連する障害に起因する可能性があることが明らかとなった。この結果について論文にて報告した (Umeda R, et al. BBRC. 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Carrasco Apolinario Magdeline E., Umeda Ryohei, Teranishi Hitoshi, Shan Mengting, Phurpa, Sebastian Wulan Apridita, Lai Shaohong, Shimizu Nobuyuki, Shiraishi Hiroshi, Shikano Kenshiro, Hikida Takatoshi, Hanada Toshikatsu, Ohta Keisuke, Hanada Reiko	4. 巻 675
2. 論文標題 Behavioral and neurological effects of Vrk1 deficiency in zebrafish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 10~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Carrasco Apolinario ME, Umeda R, Shikano K, Teranishi H, Hanada R.
2. 発表標題 Physiological functions of VRK1 in the central nervous system.
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年~2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------